

# 外来性ウイルス否定試験法

平成 22 年 3 月 3 日（告示第 394 号） 一部改正

マスターシードウイルス及びマスターセルシード中に、検出しようとする外来性のウイルスが存在しないことを調べる方法である。

## 1 試料

### 1.1 マスターシードウイルス

マスターシードウイルス 1 mL に免疫血清を加え、37℃で 1 時間又は 4℃で一夜処理し、完全に中和させたものを試料とする。

### 1.2 マスターセルシード

単層となった培養細胞を 2 群に分けて培養し、1 群は凍結融解を 3 回繰り返す、その凍結融解混合物に残りの 1 群の培養上清を混合したものを試料とする。

## 2 共通ウイルス否定試験

マスターシードウイルス及びマスターセルシードは、由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルス及びワクチンの対象動物に病原性を持つウイルスを考慮し、2.1 及び 2.2 の試験又はいずれかの試験により行う。

### 2.1 感受性細胞接種試験

#### 2.1.1 試験材料

##### 2.1.1.1 培養細胞

培養細胞の由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞及びワクチンの対象動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞を用いる。

#### 2.1.2 試験方法

##### 2.1.2.1 培養

試料 1 mL につき 70cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37℃で 7 日間培養し、次代に細胞を継代する。継代した細胞を 37℃で 7 日間培養した後、更に次代に細胞を継代し、37℃で 7 日間培養する。

##### 2.1.2.2 細胞観察

CPE の有無をすべての培養期間中少なくとも 2 日ごとに観察する。

##### 2.1.2.3 細胞染色

12cm<sup>2</sup>以上の培養細胞について培養最終日にヘマトキシリン-エオジン又はメイグリュンワルド-ギムザで染色し、顕微鏡下で CPE 及び封入体その他迷入因子に起因する細胞異常の有無を観察する。

##### 2.1.2.4 赤血球吸着

培養最終日に培養細胞をそれぞれ 18cm<sup>2</sup>以上になるように 3 群に分け、培養細胞表面をリン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄後、モルモット、がちょう及び 7 日齢以内の鶏の 0.1vol % 赤

血球浮遊液をそれぞれの群に重層し、4℃で30分間静置後20～25℃で30分間静置する。  
その後リン酸緩衝食塩液で洗浄後、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。

### 2.1.3 判定

観察期間中、培養細胞にCPE及び封入体ほか細胞異常を認めず、かつ、培養細胞に赤血球の吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

## 2.2 発育鶏卵接種試験

### 2.2.1 尿膜腔内接種試験

#### 2.2.1.1 鶏胚観察

##### 2.2.1.1.1 試験方法

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢の発育鶏卵を用いる。試料0.1mLずつを10個の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7日間培養する。培養最終日に開卵し、鶏胚の異常の有無を観察する。

##### 2.2.1.1.2 判定

鶏胚が正常に発育し、異常を認めないときは、この試験に適合とする。

### 2.2.1.2 赤血球凝集試験

#### 2.2.1.2.1 試験方法

2.2.1.1.1の培養最終日に採取した尿膜腔液に、0.5vol%の鶏赤血球浮遊液を等量加え、4℃で60分間静置し、赤血球の凝集の有無を観察する。

#### 2.2.1.2.2 判定

尿膜腔液に赤血球の凝集を認めないときは、この試験に適合とする。

### 2.2.2 漿尿膜上接種試験

#### 2.2.2.1 試験方法

生ワクチン製造用材料の規格1.1の10～12日齢の発育鶏卵を用いる。試料0.1mLずつを10個の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、37℃で5日間培養する。培養最終日に開卵し、鶏胚及び漿尿膜の異常の有無を観察する。

#### 2.2.2.2 判定

鶏胚が正常に発育し、漿尿膜に異常を認めないときは、この試験に適合とする。

## 3 特定ウイルス否定試験

マスターシードウイルス及びマスターセルシードは、原則として共通ウイルス否定試験に加え、由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルス及びワクチンの対象動物に病原性を持つウイルスを考慮し、特定ウイルス否定試験を行う。なお、3.2 個別ウイルス否定試験において規定されるウイルスについては個別ウイルス否定試験において規定される方法によること。

### 3.1 特定ウイルス否定一般試験

#### 3.1.1 蛍光抗体法

##### 3.1.1.1 試験材料

###### 3.1.1.1.1 培養細胞

培養細胞の由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞及びワクチンの対象動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞を用いる。

### 3.1.1.2 試験方法

#### 3.1.1.2.1 培養

試料 1 mL につき 70cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37 °Cで7日間培養し、次代に細胞を継代する。継代した細胞を 37 °Cで7日間培養した後、更に次代に細胞を継代し、37 °Cで7日間培養する。

#### 3.1.1.2.2 蛍光抗体法

培養最終日に医薬品各条ワクチン（シードロット製剤）の部の各項で規定するウイルスに対し、それぞれの抗血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

### 3.1.1.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.1.2 鶏接種試験

#### 3.1.2.1 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の2週齢以上の鶏を用いる。

#### 3.1.2.2 試験方法

試料 1 mL を筋肉内に、0.03mL を点眼接種又はその他適当と認められた方法で接種し、2週間後に再接種する。初回接種時及び初回接種5週後の血清を採取し、医薬品各条ワクチン（シードロット製剤）の部の各項で規定するウイルスに対する抗体を測定する。

#### 3.1.2.3 判定

初回接種時及び初回接種5週後の血清に特異抗体を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2 個別ウイルス否定試験

#### 3.2.1 鶏白血病ウイルス否定試験

##### 3.2.1.1 試験方法

鶏白血病ウイルスに感受性のある生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を用いる。

試料 1 mL につき培養後 24 時間以内の 70cm<sup>2</sup>以上の細胞に接種し、37 °Cで3～5日間培養した後、次代に細胞を継代する。継代した細胞を 37 °Cで3～5日間培養した後、更に次代に細胞を継代し、37 °Cで3～5日間培養する。

3代目の 70cm<sup>2</sup>以上の培養細胞を洗浄後、培養液の 1/20 量の 1 w/v %ゼラチン加ペロナル緩衝食塩液を加えてかき採った細胞浮遊液を3回凍結融解し、その遠心上清を採って細胞抽出液を作る。これを抗原として鶏白血病ウイルスに特異的なはと、兎又はハムスター血清、3単位の溶血素、4単位のモルモット補体及び2 vol %羊赤血球浮遊液を用いて Kolmer 法により COFAL 試験を行う。

##### 3.2.1.2 判定

細胞抽出液が COFAL 試験によって陰性であったときは、この試験に適合とする。

#### 3.2.2 細網内皮症ウイルス否定試験

##### 3.2.2.1 試験方法

鶏白血病ウイルスに感受性のある生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を用いる。

試料 1 mL につき培養後 24 時間以内の 70cm<sup>2</sup>以上の細胞に接種し、37 °Cで3～5日間培

養した初代の細胞浮遊液を、別に新しく培養した鶏胚初代細胞に接種し、37℃で4日間培養する。その細胞浮遊液を同様の方法で3代目に継代して37℃で4日間培養した後、抗細菌内皮症ウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

#### 3.2.2.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

#### 3.2.3 豚コレラウイルス否定試験

次の3.2.3.1又は3.2.3.2により試験を行う。

##### 3.2.3.1 蛍光抗体法

###### 3.2.3.1.1 試験方法

豚腎初代又は継代培養細胞を用いる。

試料4 mLを、1 mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37℃で5日間培養する。

試料接種後5日目の培養上清を採取し、その1 mLを別の3 cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37℃で24～48時間培養後、抗豚コレラウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

###### 3.2.3.1.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

##### 3.2.3.2 END法及び干渉法

###### 3.2.3.2.1 試験方法

豚腎初代又は継代細胞を用いる。

試料4 mLを、1 mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37℃で5日間培養する。

試料接種後5日目の培養上清を採取し、その0.1mLずつをそれぞれ20本（穴）以上の小試験管等に分注し、細胞増殖用培養液に浮遊した豚精巣初代細胞を0.5mLずつ加える。37℃で4日間静置培養後、培養細胞を2群に分け、END法及びWEEウイルスによる干渉法を行う。

###### 3.2.3.2.2 判定

培養細胞に豚コレラウイルスを認めないときは、この試験に適合とする。

#### 3.2.4 豚サーコウイルス否定試験

##### 3.2.4.1 試験方法

PPK-3F細胞を用いる。

試料2 mLを、1 mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、グルコサミン処理を行い、37℃で5日間培養した後、次代に細胞を継代する。継代した細胞を37℃で4日間培養した後、次代に継代し、継代した細胞を37℃で3日間培養した後、抗豚サーコウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

##### 3.2.4.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

#### 3.2.5 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス否定試験

##### 3.2.5.1 試験方法

牛精巣継代細胞を用いる。

試料2 mLを、1 mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、34～36℃で5日間培養し、CPEの有無を観察した後、細胞を10本の小試験管に分注して継代し、5日間培養し、CPEの有無を観察する。培養液を除き、1 mL中約10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>の牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイ

ルス Nose 株を含む維持用培養液 0.5mL をそれぞれに加え、34 ～ 36 °C で 7 日間回転培養し、CPE の有無を観察する。

#### 3.2.5.2 判定

観察期間中、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス接種前の培養細胞に CPE を認めず、接種後の培養細胞に CPE を認めたときは、この試験に適合とする。

#### 3.2.6 犬パルボウイルス又は猫汎白血球減少症ウイルス否定試験

##### 3.2.6.1 試験方法

猫腎初代又は継代細胞を用いる。

試料 2 mL を、1 mL につき 20cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、36 °C で 5 日間培養後、次代に継代し、36 °C で 10 日間培養する。

培養最終日の培養液に、0.2w/v % 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を等量加える。さらに、この混合液と等量の VAD6.0 液で調製した 0.5vol % の豚赤血球液を加えて、4 °C で 18 時間静置後、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.2.6.2 判定

赤血球の凝集を認めないときは、この試験に適合とする。

#### 3.2.7 ロタウイルス否定試験

次の 3.2.7.1 又は 3.2.7.2 により試験を行う。

##### 3.2.7.1 細胞観察

###### 3.2.7.1.1 試験方法

MA104 細胞を用いる。

試料 0.1mL ずつを 10 本以上の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間吸着後、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄し、適量のトリプシンを添加した培養液を加え、37 °C で 7 日間回転培養し CPE の有無を観察する。

###### 3.2.7.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

##### 3.2.7.2 蛍光抗体法

###### 3.2.7.2.1 試験方法

試料 0.1mL を 3 cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 48 時間培養後、抗ロタウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

###### 3.2.7.2.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

#### 3.2.8 牛白血病ウイルス否定試験

##### 3.2.8.1 試験方法

体重 100 ～ 200kg の健康な牛又は体重 30 ～ 50kg の健康な羊を用いる。

試料 10mL を 1 頭の牛又は羊の筋肉内に注射し、2 及び 3 か月目に採血して得た血清について、牛白血病ウイルス寒天ゲル内沈降反応抗原を用いて寒天ゲル内沈降反応を行う。

##### 3.2.8.2 判定

被検血清と抗原の間に、抗牛白血病ウイルス血清と抗原の間に認められる沈降線と融合する沈降線を認めないとき、この試験に適合とする。

#### 3.2.9 日本脳炎ウイルス又は狂犬病ウイルス否定試験法

### 3.2.9.1 試験方法

3日齢以下のマウスを用いる。

試料 0.02mL ずつを 10 匹のマウスの脳内に注射し、5 日目に採取した脳の混合乳剤遠心上清を更に 10 匹のマウスの脳内に注射し、10 日間観察する。

### 3.2.9.2 判定

マウスに死亡又は神経症状を認めないときは、この試験に適合とする。

## 3.2.10 鶏脳脊髄炎ウイルス否定試験

### 3.2.10.1 試験方法

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 6 日齢の発育鶏卵を用いる。

試料 0.1mL ずつを 10 個の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種し、37℃で 12 日間培養する。培養最終日に 5 個を開卵し、鶏胚の異常を観察する。残りは孵化させ 10 日間観察する。

### 3.2.10.2 判定

鶏胚に異常及び鶏に死亡又は神経症状を認めないときは、この試験に適合とする。